

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 01-127037
(43)Date of publication of application : 19.05.1989

(51)Int. Cl. B01J 13/02
A61K 9/58
C12N 5/02

(21)Application number : 63-187085 (71)Applicant : UNIV KINGSTON
(22)Date of filing : 28.07.1988 (72)Inventor : GOOSEN MATHEUS F A
KING GLENN A
DAUGULIS ANDREW J
FAULKNER PETER

(30)Priority
Priority number : 87 78628 Priority date : 28.07.1987 Priority country : US

(54) BIOCOMPATIBLE MICROCAPSULE AND ITS PREPARATION

(57)Abstract:

PURPOSE: To produce protein by forming a microcapsule contg. the macromolecular core material or the like enclosed by a highly permeable hydrogel membrane which is a biocompatible material having a specific mol.wt. cut-off.

CONSTITUTION: The biocompatible microcapsule contg. the macromolecular core material including the survival tissue enclosed by the first biocompatible, highly permeable hydrogel membrane consisting of the ionically interacting biocompatible material having the mol.wt. cut-off of 200 to 400×10³ is prepd. In such a case, the first membrane interacts with the biocompatible material and forms the second relatively low permeable hydrogel membrane having the mol.wt. cut-off of 40 to 80×10³. The first membrane allows the diffusion of a water-soluble crosslinkable gelatinizing agent by the passage of the part having the mol.wt. smaller than 200 to 400 ×10³ through the membrane.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]
[Date of sending the examiner's decision of rejection]
[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]
[Date of final disposal for application]
[Patent number]
[Date of registration]
[Number of appeal against examiner's decision of rejection]
[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]
[Date of extinction of right]

Copyright (C) ; 1998, 2003 Japan Patent Office

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平1-127037

⑬ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成1年(1989)5月19日

B 01 J 13/02
A 61 K 9/58
B 01 J 13/02

H-8317-4G
N-7417-4C
L-8317-4G※

審査請求 未請求 請求項の数 24 (全18頁)

⑮ 発明の名称 生物適合性マイクロカプセルおよびその調製方法

⑯ 特 願 昭63-187085

⑰ 出 願 昭63(1988)7月28日

優先権主張 ⑱ 1987年7月28日 ⑲ 米国(US) ⑳ 078628

㉑ 発 明 者 マシユーズ エフ. エ カナダ国, オンタリオ, キングストン, ウェリントン ス
ー. グーセン トリート 18

㉒ 発 明 者 グレン エー. キング カナダ国, オンタリオ, ビーターバロウ, オリオレ ドラ
イブ 958

㉓ 出 願 人 クイーンズ ユニバー カナダ国, オンタリオ ケー7エル3エヌ6, キングスト
ン(番地なし)
シテイ アット キン
グストン

㉔ 代 理 人 弁理士 青 木 朗 外3名

最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

生物適合性マイクロカプセルおよびその調
製方法

2. 特許請求の範囲

1. 直径約400-1500 μ mを有する生物適合性の
マイクロカプセルであって、

約 $200-400 \times 10^3$ の分子量カットオフを有す
るイオンの相互作用する生物適合性物質から成
る第一の生物適合性の高透過性ヒドロゲル膜によ
り囲まれた生存組織を含む巨大分子コア材料を含
んで成り；前記第一の膜は、イオンの相互作用
する生物適合性物質と相互作用して、約 $40-80 \times$
 10^3 の分子量カットオフを有する第二の比較的
低透過性のヒドロゲル膜を形成し；前記第一の膜は、
前記生存組織を懸濁させるために使われる水溶性
の架橋性ゲル化剤の約 $200-400 \times 10^3$ より小さ
い分子量を有する部分が膜を通過して拡散するのを
可能にする程、および前記マイクロカプセルが平
衡状態の方へ膨脹するのを可能にする程、十分に

透過性であり；そして、前記相互作用された膜は、
前記マイクロカプセルが置かれる培地から栄養素
を前記マイクロカプセルの中へ流入するのを可能
にする程十分に透過性であり、且つ、前記マイク
ロカプセルが前記生存組織およびそのいかなる
高分子量生産物でもマイクロカプセル内に保持し
ておく程十分に不透過性である；
マイクロカプセル。

2. 前記生存組織が、ランゲルハンス島、肝細
胞、血球、昆虫細胞、植物細胞およびハイブリ
ド細胞から成る群から選ばれる、請求項1に記
載のマイクロカプセル。

3. 前記第一および第二の膜が、正に帯電した
官能基を有する高分子物質と負に帯電した官能基
を有する高分子物質との間の反応により形成され
る、請求項1に記載のマイクロカプセル。

4. 前記正に帯電した高分子物質がアミノ基を
含み、そして前記負に帯電した高分子物質がカル
ボキシル基または水酸基を含む、請求項3に記載
のマイクロカプセル。

5. 前記第一および第二の膜が、アルギン酸のアルカリ金属塩およびポリアミノ酸から形成される、請求項4に記載のマイクロカプセル。

6. 前記アルギン酸のアルカリ金属塩がアルギン酸ナトリウムであり、そしてポリアミノ酸がポリ-L-リジンである、請求項4に記載のマイクロカプセル。

7. 生存組織をマイクロカプセル化する方法であって、

(a) 前記生存組織を、可逆的にゲル化することが可能でありそして遊離の酸基を有する水溶性高分子物質の水性溶液と混合し；

(b) 前記混合物を小滴へ成形し、そして前記小滴を硬化剤中でゲル化し；

(c) 遊離のアミノ基を含むポリマーとの反応により、 $200-400 \times 10^3$ の分子量カットオフを有する第一の膜が生成するように前記ゲル化小滴の周りに第一の生物適合性の高透過性ヒドロゲル膜を形成させて第一のマイクロカプセルを生成せしめ；

ことを含んで成る、二つの半透性ヒドロゲル膜の内部に生存組織をマイクロカプセル化する方法。

8. 前記生存組織が、ランゲルハンス島、肝細胞、血球およびハイブリドーマ細胞並びに昆虫細胞および植物細胞から成る群から選ばれる、請求項7に記載の方法。

9. 前記水溶性高分子物質が多糖ガムである、請求項7に記載の方法。

10. 前記多糖ガムがアルギン酸のアルカリ金属塩である、請求項9に記載の方法。

11. 前記アルギン酸塩がアルギン酸ナトリウムである、請求項10に記載の方法。

12. 前記アミノ基を含むポリマーがポリアミノ酸である、請求項7に記載の方法。

13. 前記ポリアミノ酸がポリ-L-リジンである、請求項12に記載の方法。

14. 前記相互作用される膜が前記本来の膜の上を覆う別個の膜である、請求項2に記載のマイクロカプセル。

15. 前記相互作用される膜が前記本来の膜と

(d) 前記第一のマイクロカプセルを、前記水溶性高分子物質を液化する溶媒中に懸濁し；

(e) 前記水溶性高分子物質の $200-400 \times 10^3$ より小さい分子量を有する部分の少なくとも1/3をマイクロカプセルの外へ拡散させそしてそのマイクロカプセルを平衡状態に膨張させるのに十分な時間、前記マイクロカプセルを水性溶媒中でインキュベートし；

(f) 前記インキュベートした第一のマイクロカプセルを正に帯電した基を含むポリマーとインキュベートし、それにより、約 $40-80 \times 10^3$ の分子量カットオフを有する相互作用された第二の比較的低透過性のヒドロゲル膜を形成させ；そして、

(g) 相互作用された前記マイクロカプセルの内部の前記生存組織を栄養培地中でインキュベートする（前記相互作用された膜は栄養素の通過を可能にする程十分に透過性であり、且つ、前記組織およびそのいかなる高分子量生産物をも前記第二のマイクロカプセルの内部に保持しておく程十分に不透性である）；

一体である、請求項2に記載のマイクロカプセル。

16. 前記昆虫細胞が温度感受性のバキュロウイルスに感染された昆虫細胞である、請求項2に記載のマイクロカプセル。

17. 前記昆虫細胞がスポドブレタ・フルギバダ (*spodoptera frugipada*) である、請求項16に記載のマイクロカプセル。

18. 前記バキュロウイルスが ts-10 *Autographa californica* 核多核体病ウイルスである、請求項17に記載のマイクロカプセル。

19. 前記昆虫細胞が温度感受性のバキュロウイルスに感染された昆虫細胞である、請求項19に記載の方法。

20. 前記昆虫細胞がスポドブレタ・フルギバダ (*spodoptera frugipada*) である、請求項16に記載の方法。

21. 前記バキュロウイルスが ts-10 *Autographa californica* 核多核体病ウイルスである、請求項19に記載の方法。

22. 前記水溶性高分子物質が少なくとも0.75

% (w/v) のカプセル内濃度を有するアルギン酸ナトリウムである、請求項2・1に記載の方法。

23. 前記水溶性高分子物質が10-20cpsの範囲における粘度を有するアルギン酸ナトリウムである、請求項21に記載の方法。

24. 前記アルギン酸ナトリウムが約15cpsの粘度を有する請求項23に記載の方法。

3. 発明の詳細な説明

(発明の分野)

本発明は、動物の細胞培養からタンパク質を生産する方法に関する。さらに詳しくは、本発明は、試験管内において抗体またはホルモンのようなタンパク質を生産するためのマイクロカプセル化方法に関する。

(発明の背景および先行技術)

抗体およびホルモンのようなタンパク質の試験管内における生産のための典型的な懸濁培養法は、起こり得る低細胞密度(10⁵細胞数/ml)のために、大スケール利用への適応性において限界が

内部を液化する。そのカプセル化されたハイブリドーマ細胞のような細胞を適当な培地に移し、そして2-3週間インキュベートする。生産物の濃度および純度は、典型的な懸濁培養により達成できるものよりも約100倍高い。下記に注意を向けられたい。

米国特許: 3,157,631; 3,780,195; 4,251,387;
4,255,411; 4,257,884; 4,322,311; 4,324,683;
4,352,883; 4,386,895; 4,389,419; 4,391,909;
4,407,957; 4,409,331; 4,487,758; 4,495,288;
4,582,799.

これらは一般に上記に記載されたマイクロカプセル化方法に関連していると思われる。しかしながら、先行技術の一重膜カプセルの内部にカプセル化された細胞は、優先的にマイクロカプセルの内面付近で増殖する傾向があることが立証された(Possillico, Biototechnology, 4, 1986)。培養期間の終わりまでに細胞はカプセルの内面の約1/2-3/4を覆うが、カプセルの全容量の1/3より少ない部分が細胞により占有され、残りの

ある。比較的大きく複雑な発酵槽は大量生産のために当然莫大な資本的支出を必要とし、それでも希望する生産物の濃度は非常に低い。さらに、ほとんどの細胞系が血清補充培地において最良に増殖するが、血清タンパク質は懸濁培地からの所望のタンパク質生産物の下流精製を非常に複雑化する。

それ故、他の処理法が提唱されており、そして低細胞密度および下流処理の問題を解決するためにマイクロカプセル化に頼ることに重点が置かれている。この方法においては、生存細胞が半透性高分子膜の内部に閉じ込められており、その方法は公開の科学文献および多数の特許において広く記載されている。生存細胞をアルギン酸ナトリウムと混合し、そして塩化カルシウムの中へ押し出してアルギン酸カルシウムのゲル化小滴を形成させる。次いでゲル状小滴をポリ-ε-リジン(PLL)のようなアミノ酸と反応させて半透性カプセル膜を形成させる。そのカプセルをクエン酸ナトリウム中でインキュベートすることにより

2/3はアルギン酸カルシウムおよびアルギン酸ナトリウムのポリマーで占有されている。それ故、抗体を閉じ込めておくための約60×10³~80×10³の分子量カットオフの膜を有するカプセルの内部に、アルギン酸塩(MW 10⁵~10⁶)が閉じ込められるので、各マイクロカプセルのわずかな部分だけが細胞増殖に利用される。さらに、生産物を回収するためにそのカプセルを破裂させる時、閉じ込められたアルギン酸塩を破裂した細胞およびタンパク質の懸濁液から分別しなければならない。それ故、カプセル内の細胞密度を明らかに増加させるための、およびマイクロカプセルのインキュベーションの前にアルギン酸塩コアを除去するための、改良された方法を必要とする。

(発明の概要)

本発明によれば、二重膜マイクロカプセルの形成が起こる3段階の操作手順を使うことによりアルギン酸塩コアの少なくとも1/3が除去されるであろうことが見出された。これは、先行技術の

二重膜カプセルについての11%のアルギン酸塩除去に対比される。

また、本発明の一つの観点によれば、本発明は直径約400-1500 μ mを有する生物適合性のマイクロカプセルを提供しており、そのマイクロカプセルは、

約200-400 $\times 10^3$ の分子量カットオフを有するイオンの相互作用的生物適合性物質から成る第一の生物適合性の高透過性ヒドロゲル膜により囲まれた生存組織を含む巨大分子コア材料を含んで成り；前記第一の膜は、イオンの相互作用的生物適合性物質と相互作用して、約40-80 $\times 10^3$ の分子量カットオフを有する第二の比較的低透過性のヒドロゲル膜を形成し；前記第一の膜は、前記生存組織を懸濁させるために使われる水溶性の架橋性ゲル化剤の約200-400 $\times 10^3$ より小さい分子量を有する部分が膜を通して拡散するのを可能にする程、および前記マイクロカプセルが平衡状態の方へ膨脹するのを可能にする程、十分に透過性であり；そして、前記相互作用された膜は、

(d) 前記第一のマイクロカプセルを、前記水溶性高分子物質を液化する溶媒中に懸濁し；

(e) 前記水溶性高分子物質の200-400 $\times 10^3$ より小さい分子量を有する部分の少なくとも1/3をマイクロカプセルの外へ拡散させそしてそのカプセルを平衡状態へ膨脹させるのに十分な時間、前記マイクロカプセルを水性溶媒中でインキュベートし；

(f) 前記インキュベートした第一のマイクロカプセルを正に帯電した基を含むポリマーとインキュベートし、それにより、約40-80 $\times 10^3$ の分子量カットオフを有する相互作用された第二の比較的低透過性のヒドロゲル膜を形成させ；そして、

(g) 相互作用された前記マイクロカプセルの内部の前記生存組織を栄養培地中でインキュベートする（前記相互作用された膜は栄養素の通過を可能にする程十分に透過性であり、並びに前記組織およびいかなるその高分子量生産物をも前記第二のマイクロカプセルの内部に残しておくのに十分な程不透性である）；

前記マイクロカプセルが置かれる培地から栄養素を前記マイクロカプセルの中へ流入するのを可能にする程十分に透過性であり、且つ、前記マイクロカプセルが前記生存組織およびそのいかなる高分子量生産物でもマイクロカプセル内に保持しておく程十分に不透性である。

本発明の別の観点によれば、本発明は、少なくとも1つの半透性ヒドロゲル膜の内部に生存組織をカプセル化する方法を提供し、その方法は、

(a) 前記生存組織を、可逆的にゲル化することが可能でありそして遊離の酸基を有する水溶性高分子物質の水性溶液と混合し；

(b) 前記混合物を小滴へ成形し、そして前記小滴を硬化剤中でゲル化し；

(c) 遊離のアミノ基を含むポリマーとの反応により、200-400 $\times 10^3$ の分子量カットオフを有する第一の膜が生成するように前記ゲル化小滴の周りに第一の生物適合性の高透過性ヒドロゲル膜を形成させて第一のマイクロカプセルを生成せしめ；

ことを含んで成る。

〔発明の一般的説明〕

上に記したように、本発明から4つの本質的段階を含む二重膜カプセル化の操作手順が予想される。第一に、培養すべき生存細胞をアルギン酸ナトリウム（海藻抽出物およびポリアニオン）と混合し、そしてゲルビーズまたは小滴を形成させるために塩化カルシウムの中へ押し出す。第二に、そのゲルビーズを濃度0.03-0.01% (w/v) の高分子量 (MW 60-500) $\times 10^3$ の、ポリ- ϵ -リジンのようなポリアミノ酸と、0.05-0.67時間反応せしめ、そして形成されたカプセルの内部をクエン酸ナトリウムでの処理により液化する。そのようにして形成された一重膜は高透過性である (MW カットオフ 200-400 $\times 10^3$)。第三に、閉じ込められたアルギン酸ナトリウムのより多くの部分を外へ拡散させそしてカプセルを平衡状態の方へ膨脹させるまでの数時間、形成された一重膜の高透過性カプセルを食塩水溶液中でインキュ

ベートする。第四に、アルギン酸塩の乏しい高透過性カプセルを、低分子量 ($MW 10-30 \times 10^3$) のポリ- ϵ -リジンのようなポリアミノ酸と、またはキトサン ($Mv = 1210 \times 10^3$) 1 モル当り 0.05 モルの硝酸ナトリウムを用いた反応により生成する $Mv = 240 \times 10^3$ のキトサン (脱アセチル化キチン) と、0.01-0.03% (w/v) のポリマー濃度において 0.05-0.67 時間反応せしめ、相互作用された低透過性の膜 (MW カットオフ $40-80 \times 10^3$) を生成させる。次いで、その二重膜においてカプセル化した細胞を先行技術におけるように 2-3 週間培地中で培養する。この時点で、相互作用された膜が、第一の膜に上張りしてある第二の膜であるか、または単に第一の膜の変質した低透過性の形であるかどうかは完全には明らかでない。

特にアルギン酸ナトリウムビーズに言及されているが、それが置かれる溶媒に関する条件の変更によってゲル化し、形状維持物体を形成することのできる無毒の水溶性物質はいずれも使用可能であるということが当業者により理解されるであろう。

他にキトサンおよびポリアクリル酸エステルを包含する。分子量は一般に約 10^4 、~約 10^6 の範囲で異なる。

本発明の方法は、ランゲルハンス島、肝細胞、赤血球、昆虫細胞、植物細胞およびハイブリドーマ細胞のような、生存組織またはその複製細胞フラクションまたは個々の細胞をカプセル化するために使用してよい。そのカプセルはそれらの内部の細胞を保護する。例えば、それらは移植されたインスリン産生ランゲルハンス島を免疫拒絶反応から保護する。マウスのハイブリドーマ細胞のようなカプセル化されたハイブリドーマ細胞は、抗-狂犬病活性を含む多くの利用のためにモノクローナル抗体を多グラム-大量生産するのに使用され得る。

(好ましい実施態様の説明)

一つの好ましい実施態様においては、好ましい球形を得るために、生存している肝細胞またはマウスのハイブリドーマ細胞を生理的食塩水中のアルギン酸ナトリウム溶液 (粘度 30-100 cps) 中に均一に懸濁することにより、細胞をポリ- ϵ -リジン-アルギン酸塩の半透性ヒドロゲルの内部に封入する。球形の小滴を典型的な小滴発生器を使って製造し、そして塩化カルシウムの硬化溶液中に集める。そのマイクロカプセルを、食塩水中の 0.03-0.1% (w/v) ポリ- ϵ -リジン ($MW 60-50 \times 10^3$) 中で 3-40 分間インキュベートし、続いて希アルギン酸塩溶液と反応させる。次いで、約 300×10^3 の分子量カットオフを有する高透過性膜の内部を液化するために、そのカプセルを等張のクエン酸ナトリウム溶液中に 4-12 分間懸濁する。膜を通してアルギン酸ナトリウムを外へ拡散させるために、およびマイクロカプセルをその平衡状態まで膨張させるために、その高透過性の一重膜を等張の食塩水中で 0.5-2 時間インキュベートする。次いで、約 60×10^3 の分子量カットオフを有する第二の低透過性膜を形成させるために、そのマイクロカプセルを 0.01-0.1% (w/v) ポリ- ϵ -リジン ($MW 10-30 \times 10^3$)

う。そのようなゲル化物質もまた、容易にイオン化してアニオン基またはカチオン基を形成するような多数の官能基を含み、そのため反対電荷の官能基を含むポリマーと作用する時にその表面が架橋して永久膜を形成し得る。大抵の多糖ガムは、天然物および合成物ともにカルボキシル基または水酸基のような負に帯電した官能基を有するこの類に属し、アミノ基のような正に帯電した反応性基を有するポリマーにより架橋され得る。また他の水溶性ガムを使用してもよいが、好ましいガムはアルギン酸のアルカリ金属塩、特にアルギン酸ナトリウムである。アルギン酸ナトリウムガムと反応するのに好ましい架橋性の生物適合性ポリマーは、ポリリジンおよび他のポリアミノ酸を包含する。ポリエチレンイミンまたは他のイミン含有ポリマーは生物適合性でなく、使用するべきではない。形成される膜の透過度は、所望の分子量を有するポリアミノ酸を注意深く選択することにより調節することができる。ポリ- ϵ -リジン (PLL) が最も好ましい高分子物質であるが、

中で0.05-0.67時間インキュベートする。生成したマイクロカプセルは直径約400-1500 μ m、好ましくは600-800 μ mを有する。内側の高MWカットオフの膜および外側の低MWカットオフの膜の厚さは5 μ m程度である。そのカプセル化された細胞を一重膜カプセルを使って送ることができるものよりも非常に高い(200-500%)カプセル内密度へ増殖させるために、そのマイクロカプセルを5%CO₂/95%空気の雰囲気下、培地(Dulbecco改良Eagle培地)中37℃で1-3週間インキュベートすることができる。二重膜カプセルを洗浄および破裂(細胞および細胞生産物を取り出すために)した後、モノクローナル抗体生産物を一重膜カプセルよりも500%に及ぶ程多い回収量で得ることが可能である。

第二の好ましい実施態様においては、温度感受性の*Autographa californica*核多角体病ウィルスの変異体(AcNPV ts-10)で感染された蛾*S. frugiperda*のさなぎの卵巣由来の昆虫細胞(*Spodoptera frugiperda*, IPLB-SF-21と称する)

取り(すなわち、細胞密度 2×10^6 細胞数/ ml)、その細胞懸濁液を1000rpmで5分間遠心し、そして培地をデカンテーションすることにより調製された。次いで、遠心管の底に残っている細胞ペレットを1.5%(w/v)のアルギン酸ナトリウム溶液(Kelco Ltd., Chicago Illinois製のKeltone LV®)中に懸濁した。そのアルギン酸塩/細胞の懸濁液を1.5%(w/v)CaCl₂溶液50 ml 中に押し出した。この懸濁液の球形の小滴はエアージェット-シリンジポンプ小滴発生器により形成された。この装置を使って、細胞-アルギン酸ナトリウムの懸濁液を、空気が調節された速度(9L/min)で流れる外装チューブ(内径3mm)の内側に設置された22ゲージ針を通して押し出した。液状の小滴がシリンジポンプにより針の先端から外へ押し進められると(20cc/時間)、その小滴は速く流れている空気流により生ずる剪断力により切り離される。一定の球形の小滴が直径約300-1000ミクロンで形成されることを確保するために、針先はCaCl₂溶液面の表面上方8cm

(それは50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の硫酸ゲンタマイシンおよび10%(v/v)熱不活性化牛胎児血清を補充したTC100培地中27℃で保存され得る)を一重膜および多重膜カプセルを形成するために前述のPLL-アルギン酸塩系においてカプセル化する。好ましくは、カプセル化操作の間の保存培地の組成は2 \times TC100であり、その組成は後に詳しく記載されており、そしてそれはアルギン酸ナトリウムをゲル化する二価の塩(Ca⁺⁺またはMg⁺⁺)および牛胎児血清をとともに含有しない。加えて、カプセル化操作において使用するアルギン酸塩の濃度は0.75%(w/v)より小さくするべきである。

例1

一重膜カプセルにおけるハイブリドーマ細胞のマイクロカプセル化

カプセル化の操作手順においては、アルギン酸ナトリウム溶液をハイブリドーマ細胞のペレットと混合した。そのペレットは、コンフルエンスに増殖している細胞を含む細胞培養の懸濁液5 ml を

に保持された。ゲル化したマイクロビーズ試料は、目盛りの付いた接眼レンズで調整される解剖用顕微鏡(Wild Heerbrugg Model M8)を使って、サイズおよび形態の一致性について検査された。固定された細胞を含むアルギン酸カルシウムゲルビーズを、円錐底を有する50 ml のプラスチック製造心管へ移動させた後、そのビーズを0.1%(w/v)CHESおよび1.1%(w/v)CaCl₂溶液各々30 ml で洗浄した。各洗浄後は、真空アスピレーターを使って上清体積を減少した。アルギン酸塩-PLLのマイクロカプセル系を用いて、ゲル化小滴を0.05%(w/v)PLL溶液(PLLの $M_v=22,000$)と6分間反応させることにより半透性カプセルを形成した。PLL溶液の添加の後、遠心管のフタを締め、そして反応時間の間そのカプセルが互いに粘着しないように、両端を支えて(end-to-end)手動で揺り動かした。生じた直径300-1000ミクロンのマイクロカプセルを次いで0.1%CHESおよび1.1%CaCl₂の各々30 ml で洗い、そして等張の食塩水の30 ml アリコートで2

回洗った。30 mlの0.03% (w/v) アルギン酸ナトリウム溶液と4分間接触させ、カプセル上に外層を形成させた。マイクロカプセルの内部を30 mlの0.05Mクエン酸ナトリウム溶液で6分間液化した。過剰のクエン酸塩を除去するために直径400-1400ミクロンのマイクロカプセルを食塩水中で数回洗浄し、次いで5つの1 mlアリコートへ分割した。各アリコートを、Isotemp Series400 CO₂ Incubator (Model 413D, Fisher Scientific Co., Napean, Ontario) において25℃の培養フラスコ内のDMEM培地中37℃でインキュベートした。

例2

多重膜カプセルにおけるハイブリドーマ細胞のマイクロカプセル化

カプセル化の操作手順の間にカプセル内のアルギン酸塩のコア部分を除去することにより、そしてその上クエン酸塩の段階においてカプセルをより大きく拡張することにより、カプセル内のアルギン酸塩溶液の粘度を減少するために、改良され

たマイクロカプセル化技術を使った。初めは、一重膜カプセルで用いたのと同じ操作手順に従った。ただし、カプセルのより大きい膨張の結果として高分子量カットオフを有するカプセルを生成させるために、膜形成の段階において高分子量のPLL ($M_v = 200,000$)を用いた。次いでクエン酸段階の後、アルギン酸ナトリウムをカプセルの外へ拡散させそしてカプセルを膨張させるために、カプセルを食塩水中で30分間インキュベートした。続いて、そのマイクロカプセルを $M_v = 22,000$ の0.04% (w/v) PLL 30 mlと6分間反応することにより、膜のカットオフ分子量を小さくした。ハイブリドーマ細胞を含む改良された(多重膜)マイクロカプセルを30 mlアリコートの食塩水中で3回洗浄し、そして30 mlの0.03%アルギン酸ナトリウム溶液と4分間反応した。非結合のアルギン酸塩を除去するためにマイクロカプセルを30 mlずつの食塩水中で2回洗浄し、そして5つの1 mlアリコートに分割した。各マイクロカプセルアリコートを10 mlのDMEM培地中37℃でインキュベ

ートした。幾つかの実験においては、PLL溶液を変質キトサンに置き換えた。

解剖用顕微鏡のもとでのマイクロカプセルの検査は、内部が液化された後約2時間までの間にカプセルが膨張することを示した。膨張現象は、PLLの分子量に正比例し、そしてアルギン酸-PLLの反応時間に逆比例することがわかった。カプセル化の標準的な操作手順において、直径600ミクロンのアルギン酸カルシウムビーズの単一調製物は、例えば、直径840ミクロンを有する一重膜カプセルおよび直径1020ミクロンを有する二重膜カプセルを生じた。後者は前者より80%大きいカプセル内容量を有する。

例3

カプセルの分子量カットオフの調節

アルギン酸塩-PLLカプセル膜の分子量カットオフは、1:アルギン酸塩-PLLの反応時間を3分~40分、2:PLLの M_v を14,000~525,000、および3:PLL濃度(カプセル化操作において使用される)を0.04~0.15% (w/v)

(すなわち、0.07~0.029 mg PLL/cdアルギン酸塩表面積)、の範囲で変更することにより調節した。そのカプセル膜の、特定の分子量のタンパク質を排除する能力は、タンパク質の拡散研究を使って分析された。これらの実験においては、ハイブリドーマ細胞をカプセル化の操作手順から省くこと以外は前述のようにして、約5 mlの単一膜のカプセルを調製した。標準タンパク質(ゲルろ過用分子量測定キット)を3-4 mlの食塩水に溶解した。遠心管の両端を支えて(end-to-end)数回ゆっくりと傾けることにより、タンパク質溶液約1 mlをカプセル5 mlおよび食塩水5 mlを含む上清と混合した。0.25~1.00時間の間隔でその上清試料を取り出し、そして3時間にわたって290nmでの吸光度を測定した。拡散タンパク質の3時間にわたる100%の排除が存在する場合、その膜はそのタンパク質に対して不透性であるとみなした。対照は5 mlのカプセルを食塩水、アルギン酸塩ビーズ、または破裂したカプセルにより置き換えられた。マイクロカプセル上または遠心管上へのタ

ンパク質の吸着の影響を分析するために、幾つかの拡散実験を前記と同じセットのカプセルを用いて3通りにおいて行なった。

拡散タンパク質としての牛血清アルブミン ($MW=66,000$) および $M_v=21,000$ の PLL を使ったアルギン酸塩-PLL の反応時間の研究は、アルギン酸塩-PLL の反応時間が増加するに従って膜の分子量カットオフが減少し、40分のアルギン酸塩-PLL 反応時間でのみアルブミンが完全にカプセルから排除されることを示した。前記カプセルを5mlの食塩水、アルギン酸塩または破裂したカプセルに置き換えた対照実験は、タンパク質拡散の結果がカプセル膜上または遠心管上へのタンパク質の吸着によるものではない、ということを示した。

種々の M_v の PLL を使い一定のアルギン酸塩-PLL 反応時間6分で調製されたカプセルを用いて行なった拡散研究は、PLL の M_v が減少するにつれてカプセル膜の分子量カットオフが約 300×10^3 (PLL の $M_v=525,000$ のとき) か

ら約 60×10^3 (PLL の $M_v=14,000$ のとき) へ減少することを示した。対照に比較して、3時間にわたりタンパク質溶液の吸光度に有意な変化がないならば、その膜は拡散タンパク質に対して不透性であるとみなした。各実験を3~5回繰り返した。ある実験においては、カプセルの1パッチが完全に拡散タンパク質を排除する一方、同タイプのカプセルの別の調製物は、幾らかのタンパク質を膜を通して拡散させた。これらの膜は拡散タンパク質を排除することができることから培界線として分類された。

PLL の M_v およびアルギン酸塩-PLL の反応時間を一定に保ちながら PLL 濃度を増加させた時、カプセル膜のカットオフ分子量は明らかに減少した。 $M_v=65,000$ の PLL およびアルギン酸塩ビーズ表面1ml当たり PLL 0.08mg または 0.029 mg の PLL 濃度で調製した、2通りのマイクロカプセルを分析した。高い PLL 濃度で調製されたカプセルは標準タンパク質を排除した。一方、低い PLL 濃度で作成されたカプセルは排除

しなかった。

カプセルの物理的強度もまた PLL の M_v およびアルギン酸塩-PLL の反応時間に依存することがわかった。カプセルを先端の細い (fine-tip) ピンセットではさみつぶすことにより比較される膜の物理的耐久性は、PLL の M_v が増加するにつれ低下する。 $120,000$ より大きい M_v の PLL を使った単一膜カプセルでは、カプセル化操作の終わりに10-20%のカプセルが破裂したことを知ることは普通であった。しかしながら、小さい M_v (14,000 - 25,000) の PLL では、その膜は厚く、質感 (texture) において皮のようであり、そして破裂しにくかった。膜の強度の増加はまた、アルギン酸塩-PLL の反応時間を増加させた時に観察された。この効果は65,000より小さい M_v の PLL で最も顕著であるが、200,000 ~ 525,000 の M_v の PLL を用いて調製されたマイクロカプセルでは事実上現われなかった。

以下余白

例 4

細胞培養の研究

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞 (マウス A c V, -II₂₀) を一重膜および多重膜のアルギン酸塩-PLL マイクロカプセル内に固定させ、DHEN 培地中 37℃ で3週間培養した。培地は毎日交換した。懸濁培養におけるハイブリドーマ細胞を対照として使用した。約2日ごとに検査される細胞密度は、増殖倍地から10個のカプセルをバスツールピペットを使って任意に取り出すにより決定された。カプセルの平均直径を測定した後 (これはカプセルの内容量を決定するのに必要とされる)、カプセルの周囲の過剰の液体を吸収性紙でふき取り、そして等張の食塩水約 100 μl を加えた。1組の細いピンセットで押しつぶすことによりカプセルを破裂させた。内径の細い (fine-bore) ピペットの中に吸引することにより混合したこの溶液の1滴を血球計算板のスライド上にのせ、そして 0.1 mm² ウエル中の細胞の数を解剖用顕微鏡の助けをかりて計測した。それぞ

れ細胞密度決定のためにこの実験を3回繰り返した。細胞を0.2%トリパンブルー色素中で1分間染色することにより、細胞の生存度を分析した。死細胞の核だけがこの染色に染まる。

3週間の培養期間の終了後、マイクロカプセル化されたハイブリドーマ細胞を培地から取り出しそして30 mlの食塩水で3回洗浄した。細い(内径100 μ m) ピペットを数回通過させることによりそのカプセルを破裂させた。カプセル内の溶液をタンパク質濃度およびモノクローナル抗体含量の分析の前までエッペンドルフ微小遠心管中4℃で保存した。

約60,000の分子量カットオフを有するアルギン酸塩-PLLの一重膜中にカプセル化されたマウスのハイブリドーマ細胞は約 10^4 細胞数/mlの細胞密度でカプセル内のアルギン酸塩マトリックス中に比較的均等に分散されていた。7日目の培養研究により大きな細胞塊の存在がカプセルの内側に認められた。これらの細胞塊は、主にカプセルの内面近くに分布するらしい。14日目までに

カプセル内の細胞の密度は 2×10^7 細胞数/mlで安定していた。第1図から、カプセルの全容量が細胞増殖のために使われるわけではないことが理解され得る。他方、多重膜カプセルは、 6×10^7 細胞数/mlのカプセル内細胞の最終密度を与えた(第2図および表1)。カプセルの全容量が細胞により占有されることが理解され得る。

表 1

カプセルの型式	細胞密度 (細胞数/mlカプセル)
懸濁液(対照)	1×10^4
一重膜	2×10^7
多重膜	10×10^7

例5

カプセル内のタンパク質およびモノクローナル抗体の回収および分析

回収されたタンパク質生産物の分子量分布をゲルろ過により分析した。カプセル内のタンパク質の試料(0.15ml)をSephadex G-200 カラム(直径2 cm \times 15 cm)上にのせ、そして抗菌剤として0.05% (w/v) のアジ化ナトリウムを含む食塩水(150mM)を使って13 ml/時間で溶出させた。0.5 mlの試料をフラクションコレクター(LKB, Ultrorac II)の助けて収集し、タンパク質濃度およびモノクローナル抗体活性について分析した。タンパク質濃度は、Bio-Rad Protein Assayを使って分析した。カプセル内のタンパク質溶液のいくつかの希釈液を調製した。未希釈の試料(0.8 ml) および適当に希釈された試料を、きれいな乾いた試験管に入れた。緩衝液(PBS)試料0.8 mlを"ブランク"の試験管に入れた。染色試薬濃縮物(Dye Reagent Concentrate)(0.2 ml)を各試料に添加した後、その溶液を穏和な反転により

混合した。30分後、その試薬のブランクに対して597nmでの光学濃度を読み取った。未知のものは、既知の濃度の標準タンパク質(ウシγグロブリン)の希釈液で作成した標準曲線から読み取った。

カプセル内溶液のSephadex G-200のゲルろ過は、多重膜カプセルが一重膜カプセルよりもカプセル1 ml当たり300%多いタンパク質産物を産生していることを示した。回収された全タンパク質をタンパク質濃度曲線の $V_e/V_o = 1.5$ から $V_e/V_o = 1.8$ までの面積から決定した。IgG抗体を標準として使うと、1.65の溶出量で溶出した(ここで、 V_e = 溶出量および V_o = 間隙容量)。

多重膜カプセルから回収されたモノクローナル抗体生産物は一重膜カプセルについてより500%多かった(表2)。加えて、上清における抗体濃度が低いことにより示されるように、多重膜カプセルから(上清への)抗体のロスが明らかに少なかった。これらの結果は、細胞培養工学において、多重膜がモノクローナル抗体のような生物学的生

産物を高い数値で産生および回収するために明らかに優れていることを示している。

表 2

抗体濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	カプセルに よる抗体の 保持率 (全量に対する%)	ハイブリドーマ 細胞系
懸濁液 (対照)	10-100	—
一重膜カプセル	—	—
・ Rupp	1000-4000**	100-83; 102-84
・ Goosan	200-900**	AcV ₁ -II ₂₀
多重膜カプセル	500-5000**	70-80
		AcV ₁ -II ₂₀

* 異なる細胞系は異なる特異的な産生能を有するので、
抗体濃度の比較の際に注意しなければならない。

(産生抗体 $\mu\text{g}/10^6$ 細胞数・日)

** カプセル内の抗体濃度

*** カプセルによる抗体の保持率 =

$$\frac{\text{カプセル内の抗体の重量}}{\text{カプセル内 + カプセル外の抗体の重量}} \times 100$$

例 6

カプセル内のアルギン酸塩含量の評価

細胞を含まないカプセル 5 ml を調整し、そのカ

プセル外の液体をデカンテーションし、次いで湿潤カプセルの重さを量り、同カプセルを空気中および減圧下で乾燥し、そして乾燥カプセルの重さを量ることにより、アルギン酸塩-PLLの多重膜カプセルの明確なカプセル内残留アルギン酸塩含量を決定した。乾燥カプセルの重量を湿潤カプセルの重量で割ることにより、カプセル内残留アルギン酸塩濃度を決定した。アルギン酸塩ビーズおよび一重膜カプセルを各々対照および参考として使用した。表 3 において理解されるように、多重膜カプセルは、60,000 の分子量カットオフの標準なマイクロカプセルよりもアルギン酸塩を 23% 少なく含んでいた。

以下余白

表 3

	カプセル内残留 アルギン酸塩含量 (% w/w)	含量 %
アルギン酸塩ビーズ (対照)	2.23	100
一重膜	1.98	89
多重膜	1.49	67

$$* \quad \frac{\text{乾燥重量}}{\text{湿潤重量}} \times 100\%$$

$$** \quad \frac{1.98}{2.23} \times 100\% = 89\%$$

例 7

PLL の代わりの膜形成ポリマーとしての化学的に変質されたキトサン

キトサンの分子量を亜硝酸塩の酸化反応により減少させた。多数の 0.1% キトサンアリコートをして、キトサンに対する亜硝酸塩が 0.01 から 0.10 モルのモル比範囲で、室温で一晩 0.1 重量% の亜硝酸ナトリウム溶液と反応させた。最後に、0.1 重量% のキトサンアリコートにつき各消化された 10 g を蒸留水で 100 g に希釈し、pH を 6.5 に調節し、そしてカプセル化に適用した。

キトサン 1 モル当り 0.03, 0.05, 0.07 モルの亜硝酸ナトリウムで反応することにより調製したキトサン誘導体を、脱アセチル化の程度、分子量および赤外線分布を測定するために検査した。脱アセチル化の程度、キトサンの側鎖アミン基を含むポリマー単位の割合、およびキチンにおいて認められないアセチル基を決定するために、Aiba (23) の技術を使った。粘度平均分子量 (\bar{M}_v) を計算するために、1 ml 当り 0.100, 0.050 および 0.010 g の濃度の試料を調製した。ASTM Standard D445 (1973) において概説された操作に続いて、各溶液試料をサイズ No. = 50 の Cannon-Fenske ルーチン粘度計の中に置いた。次いで粘度計を $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$ の恒温槽中につるした。Mark-Houwink の関係式を使うことにより、粘度平均分子量を計算することができた (表 4)。

PLL 溶液を 3.0 ml の 0.1% (w/v) キトサン誘導体 ($\bar{M}_v = 2.4 \times 10^5$, pH 6.5) で置き換えることにより、キトサン-アルギン酸塩マイクロカプセルを調製した。20 分間のアルギン酸塩-

キトサン反応時間を使った。15 mlの0.05Mクエン酸ナトリウム溶液を使ってマイクロカプセルコアを3分間で液化した。アルギン酸カルシウムへのより効果的な浸透を考慮してキトサン基本鎖の分子量を減少させ、そしておそらくカプセル膜の厚さおよび強度を増加させた。 $\overline{M}_v = 6.6 \times 10^5$ のキトサンの場合には、不変質のキトサンに関してほとんど強度増加せずに、非常に薄いそして軟質の膜が形成された(表4)。 $\overline{M}_v = 1.2 \times 10^5$ のキトサンを用いた反応については、形成されたカプセルは非常に厚い放物形であり、硬い膜がそのへこんだカプセルの周りをとり囲んでいた。反対に、 $\overline{M}_v = 2.4 \times 10^5$ の中間の分子量の誘導体で調製されたカプセルは、適度に厚くそして丈夫な膜を有する球体であった。カプセルはまた、 $\overline{M}_v = 1.6 \times 10^5$ および 3.3×10^5 のキトサンを使って調製された。両者の場合には、強固で軟質の膜をもった優れたカプセルが調製された。

キトサン-PLL-アルギン酸塩マイクロカプセルについては、カプセル化操作手順における最

初のPLL溶液を、分子量が減少されたキトサン0.1重量%に置き換えて20分間反応させた。次いで食塩水で洗浄し、そして0.03重量%のアルギン酸ナトリウムと4分間反応させた。食塩水で洗浄した後、膜を安定化するためにカプセルをPLL(0.05重量%, $\overline{M}_v = 22,000$)と6分間反応させた。ポリマーの適用の順序を除き上記のようにして、他のバッチのキトサン/アルギン酸塩/PLLカプセルを調製した。カプセルの3つのタイプ全てが食塩水中で安定であった。

マイクロカプセルはまた、細胞をアルギン酸ナトリウムと混合し、次いでその懸濁液を直接キトサン溶液の中へ押し出すことにより調製された。中間の、アルギン酸カルシウムゲルを形成させる段階は省略された。カプセルに封入された細胞は生存したままであった。

以下余白

表 4

キトサンマイクロカプセルの生成

カプセル化に 適応される キトサン 誘導体	キトサンの 分子量	キトサン／アルギン 酸塩膜の耐久性	
キトサンに対する 亜硝酸塩のモル比	$\overline{M}_v \times 10^5$	強度	柔軟性
0.10	1.2	++++	+
0.07	1.6	+++	+++
0.05	2.4	++	++++
0.03	3.3	+	++
0.01	6.6	-	-

スケール:

強度 ++ = 弱い ++++ = 強い
柔軟性 + = 脆性 ++++ = 非常に柔軟性

例 8

ウイルスに感染された昆虫細胞のカプセル化

最も低い“漏出性 (leakiness)” (すなわち、非許容温度下で野生型の表現型を発見する傾向が最も低い) を示す変異株AcNPV ts-10 試料を、野生型 (HR3) のAcNPV を1-メチル-3-ニトロ-1-ニトロソグアニジン (3 mg/ml) の存在下で増殖することにより発生させ、そして使用まで

4℃で保存した。そのウィルスは27℃で複製するが33℃では複製しない。

1.4 gのアルギン酸ナトリウム粉末 (Keltone LV, Kelco, Chicago, IL) を100 mlのKCl溶液 (蒸留水 100 ml中にKCl 0.85 gを含む溶液をKCl溶液と称することにする) に溶解することにより、1.4 %アルギン酸ナトリウム水溶液を調製した。そのアルギン酸塩溶液を15分間 100℃の沸騰浴中で加熱することにより殺菌した。1.4 %のアルギン酸ナトリウム溶液2.1 mlをKCl溶液97.9 mlに添加することにより、0.03 %のアルギン酸ナトリウム溶液を調製した。14.57 gまたは19.86 gのCaCl₂ · 2H₂Oをそれぞれ1000 mlの蒸留水に添加することにより、1.1 %および1.5 % CaCl₂ 溶液を作成した。2.0 gのCHES (2-(n-シクロヘキシルアミノ) エタンスルホン酸) (Sigma Chemical Company) および0.51 gのKClを蒸留水 100 ml中に溶解することにより、0.1 %CHES溶液を作成した。また、2.58 gのクエン酸ナトリウムおよび0.85 gのKClを蒸留水

200mlに溶解することにより、0.05Mのクエン酸ナトリウム溶液を調製した。

カプセル化溶液のpHをNaOHまたはHClを使って6.2に調整した。次いで全ての溶液を加圧下0.22mのろ過装置を過すことにより殺菌した

(Nalgene Sterilization Filter Unit, Type 2, Nalgene Company Rochester, N.Y.).

適量のポリ(ε-リジン)臭化水素塩(PLL)(Sigma Chemical Company)を殺菌済みのKCl溶液中に溶解することにより、ポリリジン溶液を調製した。

一重膜マイクロカプセル

75mlのサブコンフルエンスな細胞のフラスコから培地を注意深く除去し、そして10mlの新しい培地を添加した。次いでそのフラスコを、側面から細胞を離すために穏やかに振とうした。細胞を1000rpmで10分間遠心することにより沈澱させ、そして培地を減圧吸引により除去した。沈澱を1.4%アルギン酸ナトリウム3ml中に再懸濁した。アルギン酸塩/細胞の懸濁液2mlを1.5%

(w/v) CaCl₂ 溶液30ml中に押し出した。この溶液の小滴はエアージェット/シリンドリポンプ小滴発生器により作られた。アルギン酸塩の残りの1mlは、最初の細胞の密度および生存度を測定するのに使われた。

0.1%CHESおよび1.1%(w/v) CaCl₂の各々30mlアリコート中で洗い、そしてKCl溶液30mlアリコート中で2回洗った。細胞を含むビーズを0.05%(w/v)のPLL溶液(PLLのM_v=22,000)30mlと6分間反応させた。この後、ビーズを0.1%CHES、1.1%(w/v) CaCl₂およびKCl溶液の30mlずつで洗った。0.03%(w/v)アルギン酸ナトリウム30mlとの4分間の反応は、膜上に外層を形成させた。そのビーズをKCl溶液30mlで2回洗い、続いてそのカプセルの内部を再び液化するために、0.05Mクエン酸ナトリウム中で6分間インキュベートした。過剰のクエン酸塩を除くためにKCl溶液中で3回洗い、そして或るアルギン酸塩をカプセル外へ拡散させるために、およびカプセルを平衡状態へ

膨脹させるために、カプセルを等量のKCl溶液および2×TC 100中で20~30分間インキュベートした(穏和に攪拌しながら)。そのカプセルを30mlのTC 100完全培地中に入れ、同等の2つのアリコートに分割し、そして33℃でインキュベートした。

膜形成段階において高分子量のPLL(M_v=270,000)を使用すること以外は前述のようにして、第2のタイプの単一膜カプセルを作成した。

第3のタイプのカプセルもまた、高分子量のPLL膜を使って作成した。ただしこの場合には、0.7%(w/v)のアルギン酸塩最終濃度を与えるように、同容量の1.4%アルギン酸塩および表5に示される組成を有する2×TC 100の増殖培地中に再懸濁した。

以下余白

表 5

カプセル化 操作において使用される 昆虫培地(2×TC100)の組成	
成 分	濃度(mg/L)
無機塩類	
CaCl ₂ · 2H ₂ O	
KCl	5740.0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	2014.0
NaHCO ₃	700.0
MgCl ₂ · 6H ₂ O	
他の成分	
グルコース	2000.0
バクトリブトースプロス	5200.0
アミノ酸類	
アラニン	450.0
アルギニン · HCl	1100.0
アスパラギン	700.0
アスパラギン酸	700.0
システイニン	44.0
グルタミン酸	1200.0
グルタミン	1200.0
グリシン	1300.0
ヒスチジン · HCl · H ₂ O	6760.0
イソロイシン	100.0
ロイシン	150.0
リジン	1250.0
メチオニン	100.0
フェニルアラニン	300.0
プロリン	700.0
セリン	1100.0
トレオニン	350.0
トリプトファン	200.0
チロシン	100.0
バリン	200.0

ビタミン類	20.0
ニコチン酸	20.0
パント酸	40.0
葉酸	40.0
イノシトール	40.0
ニコチン酸	40.0
p-アミノ安息香酸	40.0
p-ピロキシン・HC β	40.0
チアミン・HC β	40.0

多重膜マイクロカプセル

初めは、最初の膜形成段階において $\overline{M}_v = 270,000$ の PLL を使用したことを除いて、一重膜カプセルにおける昆虫細胞のカプセル化の操作手段と同じ手順に従った。しかしながら、クエン酸塩の段階の後、カプセルを等量の KC β 溶液および $2 \times$ TC 100 倍地中でインキュベートし、そして低分子量のアルギン酸ナトリウムをカプセルの外へ拡散させるために、およびカプセルを膨張させるために、20~30分間両端を支えて (end-to-end) 振り動かした。KC β 溶液での3回の洗浄に続き、マイクロカプセルを $\overline{M}_v = 22,000$ の 0.02~0.15% PLL 溶液 30 ml と反応せしめることに

ブコンフルエンスの 75 ml フラスコから培地を注意深く除去し、そして新しい培地 3 ml を加えた。目盛を付された接眼レンズを有する解剖用顕微鏡を使って、フラスコのいくつかの小範囲において細胞の数を数えることにより、およその細胞密度を決定した。粘着 (細胞の感染) を可能にするため、細胞をウイルス (0.05~0.10 の感染多重度 (MOI)) と共に 33℃ で約 3 時間インキュベートした。MOI は、細胞 1 個当りに添加されるウイルスの感染単位の数値を指している。この感染された細胞の懸濁液を前述したようにカプセル化し、そして ts 10 ウイルスの複製 (ウイルスの増殖) によって非許容温度である 33℃ で培養した。4 日後、ts 10 ウイルスの複製を開始するため、封入された細胞を 27℃ の培養槽に移した。バスツールピペットを使って増殖培地から 50 カプセルを取り出すことにより、毎日昆虫細胞密度を測定した。カプセルの平均直径を測定した後 (カプセル内容量を決定するために)、カプセルの周りの過剰な液体を、皮下注射針を使って

より、膜のカットオフ分子量を減少させた。最後に、そのマイクロカプセルを KC β 溶液の 30 ml アリコートで 3 回洗い、そして 0.03% アルギン酸ナトリウム溶液 30 ml と 4 分間反応させた。非結合のアルギン酸塩を除去するために、マイクロカプセルを 30 ml ずつの KC β 溶液で 2 回洗浄し、TC 100 完全培地へ入れ、同等の 2 つのアリコートに分割し、そして 33℃ でインキュベートした。

第 2 のタイプの多重膜カプセルは、カプセル化操作において使われる最初のアルギン酸塩濃度を $2 \times$ TC 100 培地の添加により 1.4% から 0.7% へ減少させること以外は前述した操作手順を使用して作成された。

昆虫細胞の培養

温度感受性のウイルス変異株 (ts 10) に感染された昆虫細胞を、その細胞がカプセル内で増殖可能かどうかを決定するために、並びにそのウイルスがカプセル内で増殖および保持される能力を分析するために、一重膜および多重膜マイクロカプセルに封入した。これらの実験において細胞のサ

除去し、そして 0.2% トリパン青色素 (KC β 溶液中) 300 ml を添加し、そしてカプセルを破裂させた。溶液中の細胞密度は、血球計を使って測定した。実際の細胞密度は、測定数に希釈因子 ((カプセル容量 + トリパン青容量) / (カプセル容量)) および 10⁴ を掛けることにより計算された。細胞密度の決定は 3 通りにおいて実施した。カプセル試料は、ウイルス含有物の分析まで滅菌済微小遠心管中 4℃ の冷蔵庫において保存された。

毒性研究

膜形成ポリマー (アルギン酸塩および PLL) およびカプセル化の手順において使用する溶液 (すなわち、KC β 溶液、0.1% CHES、1.5% および 1.1% CaCl₂、並びに 0.05M クエン酸ナトリウム) をそれらの生物適合性 (細胞の生存度における悪影響) について分析した。各毒性研究においては、昆虫細胞を 6 cm の組織培養皿内でサブコンフルエンスまで培養した。培地を注意深く流し出し、そして細胞をカプセル化溶液 4 ml に 1 時間さらした。2 種の PLL 溶液 ($\overline{M}_v =$

22,000および270,000のPLL)を0.05%の濃度で試験した。細胞を5mlアリコートしたKC#溶液で2回洗浄した後、湿潤な環境において増殖培地(TC100)中27℃で2時間インキュベートした。その培地を流し出し、そして細胞をKC#溶液中の0.2%トリパンブルー染色液2mlにひたした。生存可能(染色されない)および生存不可能(染色される)の細胞の数を任意の5つの視野のそれぞれにおいて計測し、そして生存可能な細胞の割合を計算した。

アルギン酸塩溶液を種々の濃度で試験した。細胞を初めに沈澱させ、次いでアルギン酸塩の最終濃度が1.5, 1.3, 1.0, 0.75および0.50%(w/v)を与えるように、2.0%アルギン酸ナトリウム溶液(KC#溶液100ml中にアルギン酸ナトリウム溶液(KC#溶液100ml中にアルギン酸塩粉末3gを溶かすことにより調製した)およびKC#溶液および2×TC100培地(2価の金属イオンおよび2.0%(V/V)の仔牛胎児血清を含む)を異なる割合で混合した(表6)。2×TC

100の容量は常に全容量の1/2であった。これらの溶液を6穴(well)の培養プレートにのせ、そして27℃でインキュベートした。その6番目の穴は、対照として、遠心しTC100中に再懸濁した細胞を含有した。数日間その細胞の増殖を観察することにより、アルギン酸塩の効果調べた。

表 6

毒性試験において使用されるアルギン酸塩溶液の配合表			
アルギン酸塩の最終濃度(%)	3%アルギン酸塩の量(ml)	KC#溶液の量(ml)	2×TC100の量(ml)
1.5	5	0	5
1.3	4.3	0.7	5
1.0	3.3	1.7	5
0.75	2.5	2.5	5
0.50	1.7	3.3	5

細胞ペレットを2×TC100、3%アルギン酸塩およびKC#溶液を上表の量において混合した。アルギン酸塩/細胞の混合物を6穴の培養プレートに添加し、そして28℃でインキュベートした。

その6番目の穴は、遠心してTC100中に懸濁した細胞を含有しており、それを対照として使用した。

結果

一重膜および多重膜の標準的な操作手順により製造したカプセルは球状の形態であり、そして表面不整を全く示さなかった。一重膜カプセル内の細胞はそのカプセルの容量の至るところに分散されて保持されており、そして培養2日後、大きくなって色調において暗色になった。これらのカプセルからの幾つかの細胞の回収およびそれに続くトリパンブルー染色は、細胞がほとんど生存していないことを示した。それに比較して、多重膜カプセル内の細胞はカプセルの底に沈む傾向にあり、カプセル内溶液の粘度がより低いことを示している。培養2日後、増殖のきざしは少ししか見られないけれども、これらの細胞は健全であった(トリパン染色により確認された)。昆虫細胞の倍加時間は17~24時間であった。

0.7%アルギン酸塩/TC100/細胞の混合物

を使って製造したカプセルは非球形であり、そしてとがった先端、尾、およびしわになった面を有する傾向にあった。アルギン酸塩の低濃度およびそれ故のアルギン酸塩/細胞懸濁液の低粘度によるこの非球形は、その濃度が0.5%の時に最も優勢であり、0.6%または0.7%に増加すると明らかに減少した。高カットオフ分子量の一重膜で製造したカプセルは(0.7%または1.4%のアルギン酸塩)、容易に壊れる弱い膜を有する傾向にあり、そして結果として、カプセル内の細胞増殖培地中に放出し、増殖させた。

多重膜を有するカプセルは、鋭い先端のピンセットでカプセルを締めつけることにより判断すると、一重膜の相当物よりもより強くそしてより柔軟であった。結果として、より破裂しにくいまたは破壊しにくいカプセルとなり、そして上清において細胞数の有意な減少が認められた。細胞は増殖し、マイクロカプセルを実質上満たし、最終密度4-5×10⁷細胞数/mlに達した(第3図)。それに比較すると、懸濁培養液の最大密度は少な

くとも10倍は低い。

TCID₅₀分析は、カプセル内のウイルス力価が1ml当たり約 1×10^5 感染単位 (I.F.U.) であること、および上清のそれが約300倍低いことを示した(第4図)。これは実質上全てのウイルス(>99%)がカプセル内部に保有されたことを意味する。

毒性試験

毒性試験の結果は表7および表8において概略されている。いずれの溶液(KCl, CHES, CaCl₂およびクエン酸塩)も細胞の増殖においていかなる明白な影響をも引き起こさなかった。1.4%および0.7%のアルギン酸塩溶液にさらした細胞は、生存率が幾らか低下した。アルギン酸ナトリウムおよびTC 100の混合物(アルギン酸塩の最終濃度1.5, 1.3および1.0% (w/v))において固定された細胞は、ほとんどまたは全く増殖せず、そして普通2~3日後暗色および顆粒状に現われた。トリパン青染色は、生存している細胞がもしいくらかあったとしても少ないことを示した。

表 8

毒性試験：アルギン酸塩において固定された細胞

アルギン酸塩濃度	アルギン酸塩粘度	観 察 結 果
1.5% (w/v)	55cps	全細胞が死んで暗色
1.3% (w/v)	40cps	ほとんど全細胞が死んで暗色
1.0% (w/v)	20cps	ほとんど全細胞が死んで暗色
0.75% (w/v)	15cps	ほとんど全細胞が死んで暗色
0.50% (w/v)	8cps	ほとんど全細胞が死んで暗色

上記から、最初のカプセル内のアルギン酸塩濃度が1.4%と同じくらい高いとき、昆虫細胞が一重膜および多重膜カプセルのどちらにおいても培養され得ないことは明らかであり、実際、アルギン酸塩濃度が0.75%またはそれより少ない時のみ細胞増殖が起こることが表8から明らかである。第5図からわかるように、0.75%のアルギン酸塩は約15 cpsの粘度に相当する。この粘度では、完全な球形の小滴は形成不可能であり、むしろ涙

ししながら、低濃度アルギン酸塩/TC 100の混合物(アルギン酸塩濃度0.75および0.5% (w/v))においては、細胞増殖が観察された。細胞をPLL (Mv=22,000)にさらすと、結果として細胞の生存率の低下は実質上なく、一方PLL (Mv=270,000)にさらした細胞の75%は生存力を失なった。

表 7

毒性試験：PLLおよびカプセル化溶液

溶 液	生存細胞の比率 (%)
PLL 溶液 [0.05% (w/v)]	
Mv=22000	100
Mv=270000	24 + 1
CHES	100
KCl	100

滴形の水滴が形成される。それ故、10-20cpsからの範囲における粘度が昆虫細胞の増殖に期待される。一重膜カプセル(カットオフ約60,000)は、貧弱な細胞増殖環境を与える。カプセル内のアルギン酸塩の低含量のためカプセル内のアルギン酸塩(MW=350,000)の多くが多重膜カプセルと共に得られることは明らかであるので、一重膜カプセル(カットオフ約300,000)において細胞増殖は改良される。マイクロカプセルにおける温度感受性バキュロウイルスの複製は、数でずつ培養温度を下げることにより調節され得る。また、ウイルスの複製および起こり得る組換えタンパク質の産生が始まるのを打切ることが可能な非許容温度で、昆虫細胞を高密度まで培養することができる。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、60,000の分子量カットオフを有するアルギン酸塩-PLLの一重膜を使ってカプセル化されたマウスのハイブリドーマ細胞の21日間にわたる組織培養の結果を示す写真であり、生物の形態を表わす図面に代る写真である。

第2図は、アルギン酸塩-PLLの多重膜マイクロカプセルを使ってカプセル化されたマウスのハイブリドーマ細胞のDMEM培地中37℃での12日間にわたる組織培養の結果を示す写真であり、生物の形態を表わす図面に代る写真である。

第3図は、培養日数に対する昆虫細胞密度の動態を表わすグラフである。

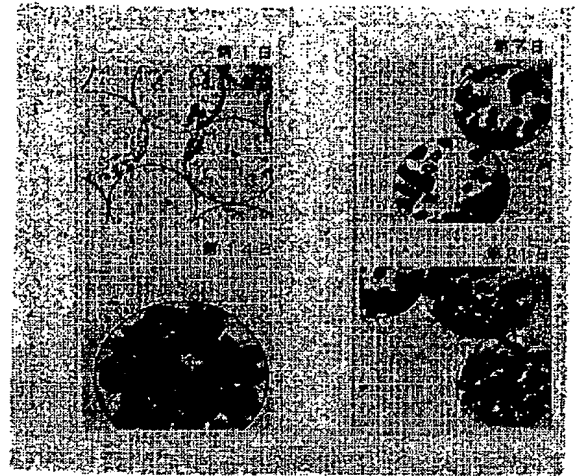
第4図は、培養日数に対するウイルス濃度の動態を表わすグラフである。

第5図は、アルギン酸塩濃度と粘度との間の相互関係を示すグラフである (Kelco Handbook第2版より引用)。

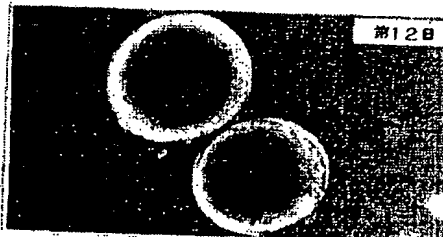
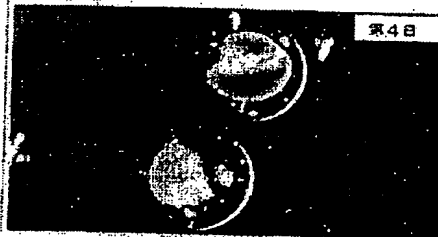
以下余白

図面の浄書(内容に変更なし)

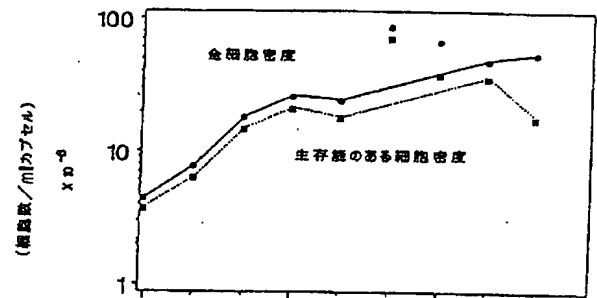
第1図



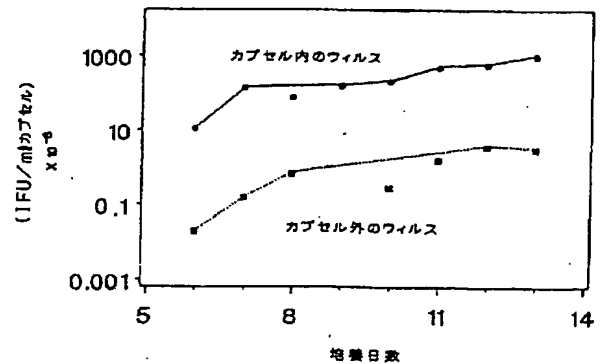
第2図



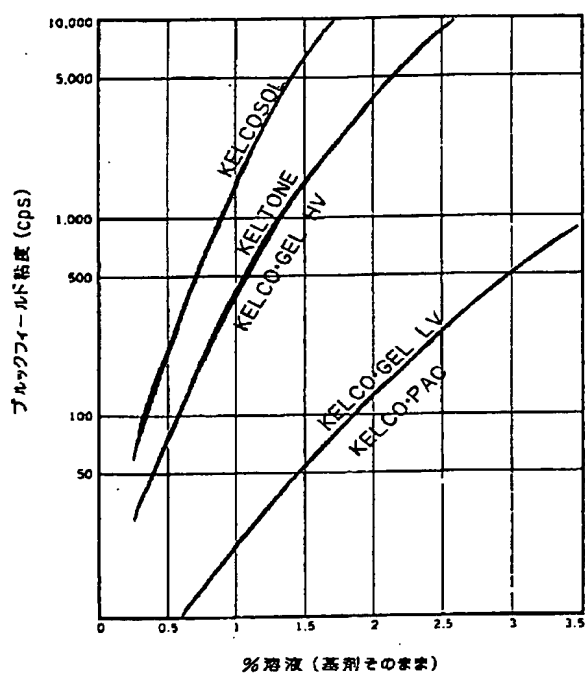
第3図



第4図



第 5 図



第1頁の続き

⑤ Int. Cl.⁴

C 12 N 5/02

識別記号

庁内整理番号

8515-4B

⑫発明者 アンドリュー ジェ
イ. ドーグリズ

カナダ国, オンタリオ, キングストン, カレツジ ストリ
ート 98

⑬発明者 ビーター ホールクナ
ー

カナダ国, オンタリオ, キングストン, ライト クレス.
54-115

手続補正書(方式)

昭和63年11月21日

特許庁長官 吉田文毅殿

1. 事件の表示

昭和63年特許願第187085号

2. 発明の名称

生物適合性マイクロカプセルおよびその調製方法

3. 補正をする者


事件との関係 特許出願人

名称 クイーンズ ユニバーシティ アット
キングストン

4. 代理人

住所 〒105 東京都港区虎ノ門一丁目8番10号

静光虎ノ門ビル 電話 504-0721

氏名 弁理士(6579) 青木 朗 (外3名) 

5. 補正命令の日付

昭和63年10月25日(発送日)

6. 補正の対象

図面

7. 補正の内容

図面の浄書(内容に変更なし)

8. 添付書類の目録

浄書図面

1通